

ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL SEMEN DE PUYE *GALAXIAS MACULATUS* (JENYNS, 1842) (SALMONIFORMES: GALAXIIDAE)

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE MILT OF PUYE *GALAXIAS MACULATUS* (JENYNS, 1842) (SALMONIFORMES: GALAXIIDAE)

Iván Valdebenito, Juan Bariles, Rolando Vega, Patricio Dantagnan, Aliro Bórquez y Eriko Carreño

RESUMEN

En la presente investigación se estudió cuali y cuantitativamente el semen del puye (*Galaxias maculatus*). Para ello se capturaron especímenes adultos ($6,24 \pm 0,84$ cm de longitud estándar) de aguas límnicas del Sur de Chile y luego fueron mantenidos en cautiverio. Una vez maduros, diez especímenes fueron anestesiados y mediante masaje abdominal se les extrajo una muestra de semen que se sometió a examen visual, recuento espermático, espermatocrito y motilidad. Los resultados obtenidos muestran que el semen del puye es poco abundante (máximo 0,2 ml por individuo), de color blanquecino y gran viscosidad. Cuantitativamente se encontró un promedio de $55,3 \times 10^6$ espermatozoides/ml, un espermatocrito de 89,63 % y una correlación entre ambas variables de $r=0,97$. La motilidad frente a distintos activadores es muy baja y sólo se observó una motilidad igual a 2 (en una escala de 0 a 5) por aproximadamente 30 min al utilizar un activador en base a carbamida.

Palabras claves: Peces, reproducción, semen, espermatozoide, motilidad.

ABSTRACT

In the present investigation milt of puye (*Galaxias maculatus*) was studied qualitatively and quantitatively. Adult specimens (6.24 ± 0.84 cm of standard length) were captured from fresh waters of the South of Chile and were kept in captivity. Once they were mature, the specimens were anesthetized and a sample of milt was extracted by stripping. This was subjected to visually examined and spermatic count, spermatocrit and sperm motility determined. The results obtained show that milt of puye is not very abundant (maximum 0.2 ml per individual), of a whitish color and great viscosity. Quantitatively, it was found an average of 55.3×10^6 sperm/ml, a spermatocrit of 89.63 % average with a correlation between both variables of $r=0.97$. Motility check with different activators is very slow and it was only observed a motility equal to 2 (in a scale of 0 to 5) for approximately 30 min when carbamide was used.

Key words: Fish, reproduction, milt, sperm, motility.

Fecha de recepción: 9 - 11 - 94. Fecha de aceptación: 28 - 10 - 95.

INTRODUCCION

Galaxias maculatus es un pequeño pez salmóniforme cuyo estado juvenil cristalino es intensa-

mente explotado para satisfacer la demanda de restaurantes y hoteles nacionales e internacionales que lo ofrecen como un fino plato de mesa. Esto ha hecho que la especie se encuentre en peligro de extinción y sus poblaciones naturales colapsadas. Estos antecedentes muestran la necesidad de preservar esta especie median-

te su cultivo, con fines comerciales y/o de repoblamiento. Para esto es fundamental conocer y manejar diversas etapas del ciclo de vida de la especie, hábitos alimentarios, condiciones de cultivo, tecnoestructura y manejar en forma adecuada los procesos reproductivos como son los desoves, fecundación e incubación.

Se ha estudiado la gametogénesis, el ciclo reproductivo, los hábitos alimentarios de poblaciones naturales y su alimentación artificial y se ha establecido la tecnoestructura mínima para su cultivo (Campos, 1970, 1972, 1973, 1974, 1979; Peredo & Sobarzo, 1993; Vega *et al.*, 1993; Dantagnan *et al.*, 1995). Entre los estudios sobre las características seminales de peces de interés comercial, destacan los trabajos de Pérez (1978) y Almendras (1993) en trucha arco iris, desconociéndose totalmente antecedentes biológicos del semen del puye. Por ello, el objetivo de este trabajo es caracterizar cuali y cuantitativamente el semen de *G. maculatus*, antecedentes esenciales para el manejo artificial de los procesos reproductivos de la especie en pisciculturas con fines comerciales o de repoblamiento.

MATERIALES Y METODOS

Se capturaron en el mes de septiembre de 1993 aproximadamente 500 especímenes silvestres adultos de *G. maculatus* en zonas del río Cautín próximas a la ciudad de Temuco, IX Región, Chile. El acondicionamiento se efectuó en estanques circulares de 100 l de capacidad, con flujo abierto y alimentados con pellet comercial de trucha al que se le ajustó el contenido lipídico. Una vez alcanzada la madurez sexual (fines de octubre), los especímenes fueron anestesiados con MS-222 para posteriormente extraer el semen por masaje abdominal.

El semen de 10 individuos se utilizó para determinar la densidad espermática (número de espermatozoides por mm³) y el espermato-crito (volumen porcentual de espermatozoides en el semen). Se utilizó cámara de Neubauer según metodología tradicional utilizada para el recuento hematológico descrito por Oppenheim (1973). El espermato-crito se cuantificó mediante microcentrifugación por 12 min a 10.000 rpm, similar a la técnica señalada por

Oppenheim (1973) para el hematocrito. Ambas variables se ajustaron a una ecuación de regresión por el método de los mínimos cuadrados.

La motilidad fue evaluada en semen combinado de cinco machos, sometiendo pequeñas alícuotas a la acción de 9 diferentes activadores (Tabla 1) a temperatura ambiente de 13 °C y bajo observación microscópica con un aumento de 10x según metodología descrita por Billard y Cosson, 1989. La escala de evaluación fue la utilizada por Sánchez-Rodríguez & Billard (1977), estos autores utilizan un rango de valores de 0 para la nula actividad flagelar y 5 para la máxima (Tabla 2).

Tabla 1: Soluciones utilizadas en la activación espermática de *Galaxias maculatus*. Activadores:

Solutions used for activation of the sperm of *Galaxias maculatus*. Activators:

- 1: Carbamida 0,3 % más cloruro de sodio al 0,4 %.
- 2: Solución fisiológica con agua de río a pH = 9.
- 3: Agua de río al 125 mM de NaCl más 200 mM de tris a pH = 9.
- 4: Agua de río natural a pH = 7,5.
- 5: Agua de pozo a pH = 7,2.
- 6: Solución de ac. bórico (1,22%) y tetraborato disódico (7,6%) diluido.
- 7: Agua de río con lavado de ovocitos.
- 8: Agua de mar, 5 ‰.
- 9: Agua de mar, 10 ‰.

Tabla 2: Escala de evaluación de la motilidad espermática según Sánchez-Rodríguez & Billard (1977).

Scale used to assess sperm motility according to Sánchez-Rodríguez & Billard (1977).

VALOR	TIPO MOTILIDAD
5	Todos los espermatozoides se desplazan vigorosamente, es imposible fijar la vista en uno de ellos.
4	La mayoría de los espermatozoides se desplazan rápido, algunos lo hacen lento.
3	Los espermatozoides presentan tres comportamientos: - algunos se desplazan vigorosamente. - algunos se desplazan lentamente. - algunos están inmóviles.
2	Pocos espermatozoides se desplazan rápidamente, muchos lo hacen lentamente. La mayoría está inmóvil.
1	Algunos espermatozoides se agitan ligeramente. La mayoría está inmóvil.
0	Todos los espermatozoides están inmóviles.

Debido al escaso volumen de semen extraído de cada individuo, no fue posible evaluar su fertilidad.

RESULTADOS

El máximo volumen de semen extraído por individuo fue de 0,2 ml, correspondiendo éstos a 10 machos adultos de una longitud estándar media de $6,24 \pm 0,84$ cm. El semen se observa de color blanquecino y denso, frecuentemente el pequeño volumen extraído se adhiere a la piel del individuo, dificultando su extracción y manipulación.

El análisis cuantitativo se realizó con una muestra de 10 individuos y el semen mostró una densidad espermática media de $55,33 \pm 11,13$ ($\times 10^6$) espermatozoides/ mm^3 , con un valor máximo de $68,20 \times 10^6$ espermatozoides/ mm^3 y un mínimo de $42,40 \times 10^6$ espermatozoides/ mm^3 . El valor medio del espermatocrito fue de $89,63 \pm 7,65$ %, con un máximo de 100 % y mínimo de 80 %. Al correlacionar la densidad espermática con el porcentaje de espermatocrito, se determinó un alto grado de asociación entre ambas variables, obteniéndose un $r=0,97$ (Fig. 1).

El máximo valor de la motilidad espermática observada según la escala de Sánchez-Rodríguez & Billard (1977) es de "2", con un activador en base a carbamida. Luego se determinó una motilidad igual a "1" con agua de río tamponada y tris y el valor "0" fue observado con otras seis soluciones activadoras (Fig. 2). En estos últimos se encuentra el agua de río sin tratamiento. La duración de la motilidad alcanzó un tiempo aproximado de 30 min, tiempo después del cual sólo se observa una vibración que dura más de un día.

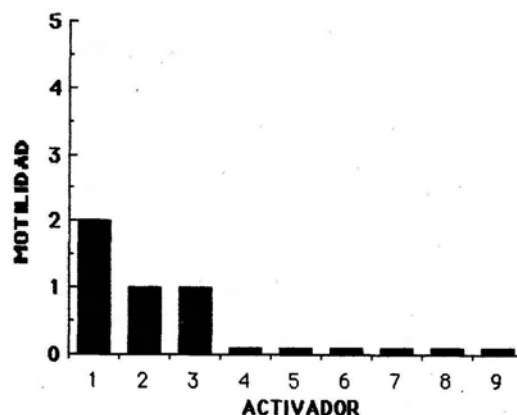


Figura 2: Nivel de motilidad obtenida con cada activador para el semen de *Galaxias maculatus* según la escala de motilidad descrita por Sánchez-Rodríguez & Billard (1977).

Level of motility attained by the sperm of *Galaxias maculatus* with each activator according to a scale described by Sánchez-Rodríguez & Billard (1977).

En experiencias rutinarias desarrolladas en laboratorio, se ha observado regularmente esta baja motilidad del espermatozoide de *G. maculatus*. Sin embargo, se han obtenido en muchas experiencias, porcentajes de fecundación de hasta un 100% al utilizar semen con características de volumen, densidad y motilidad, similares al analizado en esta experiencia (datos sin publicar).

La baja motilidad observada en el espermatozoide de *G. maculatus* es una característica atípica para los peces, que podría ser el resultado de una situación de manejo o una estrategia reproductiva aún no conocida. En salmónidos, los espermatozoides una vez maduros se almacenan en un virtual conducto deferente inmersos en el fluido testicular, donde permanecen inmóviles (Levanduski & Cloud 1988), producto de los altos niveles de K^+ del semen (Schlenck & Kahmann, 1937; Billard & Jalabert

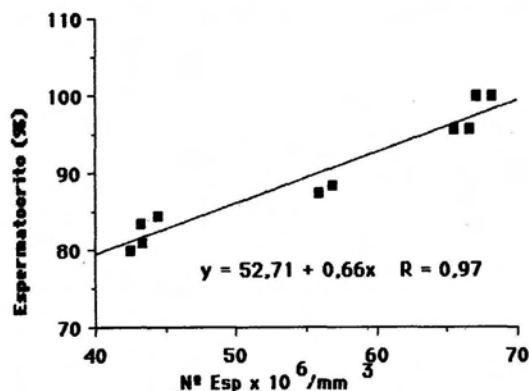


Figura 1: Correlación obtenida entre densidad espermática (N° espermatozoides/ $\text{mm}^3 \times 10^6$) y espermatocrito (%) para el semen de 10 especímenes adultos de *Galaxias maculatus*.

Correlation between sperm density (Number of sperm cells / $\text{mm}^3 \times 10^6$) and the spermatocrit (%) for the milt of 10 *Galaxias maculatus* adults.

1974; Billard 1990; Perchec *et al.*, 1993). Su actividad flagelar empieza al tomar contacto con el agua, solución salina o fluido ovárico (Levanduski & Cloud 1988). Estas soluciones no han resultado totalmente efectivas en *G. maculatus*. La actividad flagelar del espermatozoide de trucha llega sólo a 20-30 seg (Billard & Cosson 1988; 1989; Billard 1990; Perchec *et al.*, 1993), en cambio, en el puye se ha observado una actividad flagelar de aproximadamente 30 min. Sin embargo, Campos (1970) señala que el espermatozoide de esta especie permanece varios horas con actividad flagelar. Por otra parte, en forma rutinaria se ha observado que los espermatozoides mantienen una leve vibración después de 24 h de ser diluidos en solución fisiológica, aún cuando no se ha evaluado su capacidad fecundante.

La motilidad del espermatozoide depende además de otros factores, como la concentración externa de Ca^{+} (Perchec *et al.*, 1993), ya que sin este ión en el medio extracelular, la motilidad no se gatilla y la reposición de éste después de 15 min es capaz de iniciar nuevamente la actividad flagelar en el espermatozoide de truchas (Billard & Cosson 1988). Para espermatozoides de salmónidos, el pH del medio idealmente debe ser 9 (Nomura 1964; Baynes *et al.*, 1981; Billard, 1990; Perchec *et al.*, 1993), y la temperatura también es un factor que afecta la actividad espermática en peces (Cosson *et al.*, 1985). Billard & Cosson (1988) señalan que en truchas, las temperaturas de 25 °C provoca mayor movimiento flagelar, pero por un tiempo menor que el obtenido a 5 °C. En *G. maculatus*, a pesar de haber probado gatillar la actividad espermática con nueve activadores que aportan los iones, pH y temperatura dentro de los rangos señalados en literatura, no fue posible activar la motilidad espermática más allá de un nivel 2.

La densidad espermática es muy alta en salmónidos, alcanzando entre $7,12$ y $18,7 \times 10^6$ espermatozoides/ mm^3 en especies como trucha arco iris, salmón coho y salmón del Atlántico (Pérez, 1978; Bouck & Jacobson, 1976; Aas *et al.*, 1991). En cambio, *G. maculatus* registra valores mucho mayores que los señalados, lo que se corrobora con los valores del espermatozocrito. Bouck & Jacobson (1976) señalan un espermatozocrito de 27,1% para trucha cabeza de acero y 25,6 % para salmón coho. Aas *et al.*

(1991), determinan para *Salmo salar* un espermatozocrito de 23,4%. En cambio, *G. maculatus* registró una media de 89,6 %, lo que se correlaciona con la alta densidad observada en el semen de esta especie. La alta correlación obtenida entre la densidad espermática y espermatozocrito es mayor a la obtenida por Bouck & Jacobson (1976) en semen de trucha. Debido a esta alta correlación, se recomienda utilizar el espermatozocrito debido a su alta precisión y rapidez, para cuantificar el número de espermatozoides.

Estas diferencias seminales observadas entre *G. maculatus* y otras especies salmonídeas son difíciles de explicar, aún cuando no se descarta la posibilidad que los especímenes, al estar mantenidos en cautiverio, no logren una "capacitación espermática" óptima, fenómeno observado en algunas especies de carpas chinas y colosomas. Por otra parte, esta baja actividad flagelar podría ser normal y el espermatozoide necesitar del movimiento mecánico del agua (corriente u oleaje) para encontrar el ovocito y fecundarlo, ya que a pesar de su inmovilidad, el espermatozoide es fértil.

Estos resultados muestran la necesidad de continuar estudiando los aspectos de la biología reproductiva de esta especie, ya que de esta manera se podrá obtener óptimos resultados en las fertilizaciones artificiales y se asegurará la obtención de un número adecuado de larvas que permitan reiniciar un nuevo ciclo productivo. Sólo así se podrá asegurar la existencia de las poblaciones de puye en nuestros cuerpos de agua, o intentar su manejo en piscicultura.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por los Proyectos FONDECYT N° 1930134; DIUCT N° 93-2-03 y 92-2-02 y la colaboración de BIOMASTER, empresa que proporcionó el alimento para la mantención de los especímenes cultivados.

LITERATURA CITADA

- AAS, G.H., T. REFSTIE & D. GJERDE. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125-132.
- ALMENDRAS, F.E. 1993. Ensayo de un sistema de criopreservación de semen de salmonídeos aplicado a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para

- optar al Grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. U. Austral de Chile. 46.
- BAYNES, S.M., A.P. SCOTT & A.P. DAWSON. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*, 19: 259-267.
- BILLARD, R. 1990. Artificial insemination in fish. In *Marshall's Physiology of reproduction*. G.E. Lamming (Ed.), 2: 870-888.
- BILLARD, R. & M.P. COSSON. 1988. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mykiss*; effect of pH and temperature. *Les colloques de l'INRA*, 44: 161-167.
- BILLARD, R. & M.P. COSSON. 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. In: *Aquaculture, a biotechnology in progress*, N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium : 449-503.
- BILLARD, R. & B. JALABERT. 1974. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. II. Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamètes avant et après insémination. *Annales de biologie animale, biochimie et biophysique* 14: 601-610.
- BOUCK, G.R. & J. JACOBSON. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105: 534-535.
- CAMPOS, H. 1970. *Galaxias maculatus* (Jenyns) en Chile, con especial referencia a su reproducción. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Santiago-Chile*. 31: 5-20.
- CAMPOS, H. 1972. Karyology of three galaxiid fishes *Galaxias maculatus*, *G. platei* and *Brachygalaxias bullocki*. *Copeia*, 2: 368-371.
- CAMPOS, H. 1973. Migration of *Galaxias maculatus* (Jenyns) (Galaxiidae: Pisces) in Valdivia estuary, Chile. *Hydrobiologia*, 43(3-4): 301-312.
- CAMPOS, H. 1974. Population studies of *Galaxias maculatus* (Jenyns) (Osteichthys: Galaxiidae) in Chile with reference to the number of vertebrae. *Studies on the Neotropical Fauna*, 9: 55-76.
- CAMPOS, H. 1979. Avances en el estudio sistemático de la familia Galaxiidae (Osteichthys: Salmoniformes). *Archivos de Biología y Medicina Experimental*, 12: 107-118.
- COSSON, M. P., R. BILLARD, J. L. GATTI & R. CHRISTEN. 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 46: 71-75.
- DANTAGNAN, H.P., A. BÓRQUEZ, J. BARILES, I. VALDEBENITO & R. VEGA. 1995. Effects of different diets on the survival and growth of puye (*Galaxias maculatus*). *Larvi '95-Fish & Shellfish Larviculture Symposium*. Gent, Belgium. P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelands (Eds.). European Aquaculture Society, Special Publication, (24): 435-437.
- LEVANDUSKI, M. J. & J.G. CLOUD. 1988. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of nonmotile sperm on fertility. *Aquaculture*, 75:171-179.
- MITCHEL, CH. P. 1989. Laboratory culture of *Galaxias maculatus* and potential applications. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 23: 325-336.
- NOMURA, M. 1964. Studies on reproduction of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to egg taking. VI. The activities of spermatozoa in different diluents and preservation of semen. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 30: 723-733.
- OPPENHEIM, I. A. 1973. *Manual para técnicos de laboratorio*. Ed. Panamericana. Bs. As.: 188.
- PERCHEC, G., J. COSSON, F. ANDRÉ & R. BILLARD. 1993. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 9: 129-149.
- PEREDO, S. & C. SOBARZO. 1993. Microestructura del ovario y ovogénesis en *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) (Teleostei: Galaxiidae). *Biología Pesquera*, 22: 23-32.
- PÉREZ, W.A., 1978. Determinación de las variables seminales fundamentales en la trucha arco iris (*Salmo gairdneri* Gibbons, 1855) en la Piscicultura de Pullinque, Chile. Tesis de Grado para optar al Título de Médico Veterinario. U. Austral de Chile. Valdivia. 29.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. & R. BILLARD. 1977. Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc en ciel maintenu a des températures voisines de 0° C. *Bulletin Francais de Pisciculture*, (265): 143-152.
- SCHLENK, W. & H. KAHMANN. 1937. Die chemische Zusammensetzung des spermaliqours und ihre physiologische Bedeutung. *Untersuchung am Forellensperma*. *Biochemische Zeitschrift*, 295: 283-301.
- VEGA, R., A. PIZARRO, D. FIGUEROA, J. BARILES, A. MARDONES, S. PEREDO, G. LARA, VALDEBENITO & F. FIGUEROA. 1993. Tolerancia a la salinidad de una población lacustre de puyes *Galaxias maculatus*. *Fac. Cs. del Mar. U. Católica del Norte. Coquimbo, Chile. Serie Ocasional* 2: 231-238.